Aus der Universitätskinderklinik der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. J. Ströder

Über das Verhalten des Orthophosphates im Gewebe bei diätetischer Rachitis

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Ernst-Heinrich Kolb
aus Iserlohn

Würzburg 1966

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544724_0035

Aus der Universitätskinderklinik der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. J. Ströder

Über das Verhalten des Orthophosphates im Gewebe bei diätetischer Rachitis

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Ernst-Heinrich Kolb
aus Iserlohn

Würzburg 1966

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Referent: Professor Dr. med. J. Ströder

Tag der Promotion: 22. 6. 67

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Theoretischer Teil	2
I. Der Calcium-Phosphatstoffwechsel	2
II. Regulation	3
III. VitaminD-Mangelrachitis und Pathogenese der Hypophosphataemie	7
Problemstellung	11
Methodik	12
I. Rachitiserzeugung und Haltung der Versuchstiere	12
II. Serumphosphatbestimmung	13
III. Untersuchungen zum Säure-Base-Haushalt	14
IV. Phosphatbestimmung im Gewebe	16
1. Narkose und Gewebsfixierung	16
2. Aufbereitung der Gewebsproben	16
3. Extraktion des Gewebspulvers	16
4. Phosphatanalyse	18
Bestimmung des Extrazellulärraumes	22
Statistische Auswertung	23
Vorversuche	26
I. Die Narkose	26
II. Werte vom Herzmuskel des Hundes	28
III. Leberwerte bei Normaltieren	29
Ergebnisse	3o
Diskussion	41
Zusammenfassung	43
Literatur	I - VII

THEORETISCHER TEIL

I. Der Calcium-Phosphatstoffwechsel

Im Organismus steht der Calcium-Phosphatstoffwechsel durch Regulationsmechanismen in abhängiger Beziehung. Treten Änderungen der Menge oder des Zustandes der Phosphate ein, so haben diese Änderungen auch immer solche der Menge oder des Zustandes des Calcium zur Folge. Eine völlig isolierte Darstellung des Phosphatstoffwechsels ist deshalb nicht möglich, der Ablauf der jeweiligen Stoffwechselvorgänge zwingt immer wieder zu vergleichenden Gegenüberstellungen.
Obwohl es viele Arbeiten gibt, die sich mit den Funktionszusammenhängen beider Ionen mit Intestinaltrakt, Niere, Knochen und der Beeinflussung durch Parathormon und Vitamin D befassen, ist es noch nicht möglich, aus den experimentellen Ergebnissen ein allgemein gültiges, logisches Bild zu entwickeln. Immer noch sind wir auf vereinfachende Hypothesen und Spekulationen angewiesen.

Zu den wichtigsten physiologischen Konstanten gehört die Calciumionenkonzentration der extrazellulären Flüssigkeit. Calcium ist nicht nur ein bedeutender Bestandteil der Membranen, seine Konzentration ist auch von entscheidender Wichtigkeit für die Membranpermeabilität, im besonderen für die Nervenfunktion und Muskelkontraktion.[6] DALTON und HASHIMURA[17/31] wiesen nach, daß die Impulsleitung im Nerv, die Ruhe- und Aktionspotentiale in hohem Ausmaß von der äußeren Calciumkonzentration im Serum abhängig sind, ebenso der Ionentransport im Muskel.[72] Weiterhin wird die Calciumkonzentration im Serum heute als der Hauptregulator für die Aktivität der Parathyreoidea angesehen.[14]

Als zweite wichtige Konstante bezeichnet FANCONI[21] das Aktivitätsprodukt Calciumionen x Phosphationen ($A_{Ca++} \times A_{HPO_4--} = k$), welches bestimmend ist für die Verknöcherung und Knochenapposition. Die Konstanz des Produktes Ca x P im Serum wird durch das Schaukelphänomen zwischen Ca und P aufrecht erhalten, für dessen Zustandekommen die Wirkung der Para-

thyreoidea und andere noch unbekannte Mechanismen verantwortlich sind. Phosphationen stellen den Hauptanteil der intrazellulären Anionen und haben ihre wesentliche Bedeutung als Komponente vieler Zellbestandteile, Phospholipide, Phosphoproteine und phosphorylierter Kohlehydrate sowie im Intermediärstoffwechsel und Energiehaushalt.[6] Der Einfluß des Phosphats auf die Calciumresorption ist noch unklar. (Übersicht bei NICHOLAYSEN[51])

Die intestinale Resorption des Phosphats wurde von CRAMER[15] und HARRISON[29] bei Versuchen in vitro an der isolierten Darmschlinge untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Resorptionsgeschwindigkeit im Duodenum am größten, in den unteren Darmabschnitten viel kleiner, die resorbierte Menge aber größer ist. Die Phosphationenkonzentration der extrazellulären Flüssigkeit ist variabler als die des Calcium. Je nach Alter und Stoffwechselzustand kann sie ohne akute, klinisch faßbare Folgen Schwankungen unterworfen sein.[9] Das Plasmaphosphat ist beinahe vollständig ultrafiltrierbar. Man nimmt allgemein eine maximale tubuläre Rückresorption an. Noch nicht geklärt ist die Frage, ob zusätzlich in den distalen Nierentubuli bei Säugetieren Phosphat sezerniert wird. Diese Sekretion wurde am Huhn nachgewiesen[46] und in anderen Fällen vermutet, bei denen die renale Phosphatclearence größer ist als die totale Filtratmenge.[53] (siehe auch BARTTER[4]) Nach NORDIN[55] wird die Konzentration des anorganischen Phosphates durch die Beziehung zwischen intestinaler Phosphatresorption und renalem Schwellenwert bestimmt, die Regulierug der Plasmakonzentration hingegen geschieht durch die tubuläre Rückresorption.

II. Regulation

Die beider Hauptregulatoren des Calcium-Phosphatstoffwechsels sind das Parathormon und Vitamin D, wobei in neuester Zeit eine dritte Komponente hinzukommt, das Calcitonin, ein Hormon der Parathyreoidea bzw. Thyreoidea, das eine rasch einset-

zende Senkung des Serumphosphatspiegels bewirkt, COPP.[12/13] Aller Wahrscheinlichkeit nach erfolgt diese Regulation über drei Erfolgsorgane, den Darm als Versorgungs-, die Niere als Ausscheidungs- und den Knochen als Speicherorgan.[6]

Die anerkannte Wirkung des Parathormons besteht in der Konstanthaltung der Calciumionenaktivität in Serum und extrazellulärer Flüssigkeit auf einem höheren Niveau, als durch die Löslichkeit der Knochenmineralien gegeben ist.[50] Dies geschieht durch Einwirkung auf alle drei Erfolgsorgane und das Calciumproteinat des Serum.

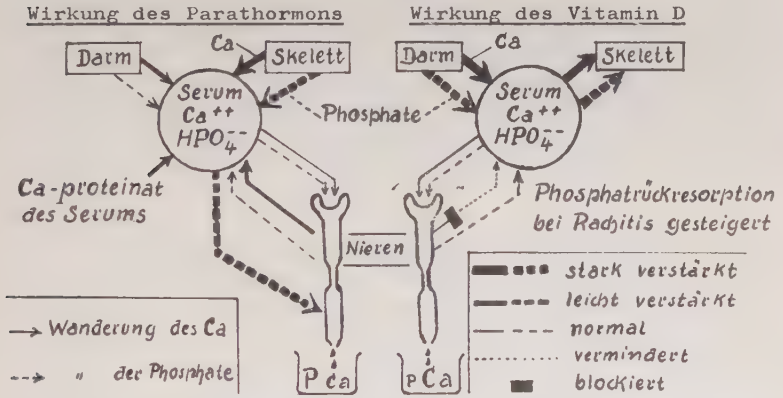

Abb. 1. Schematische Darstellung der Regulation des Calcium- und Phosphatspiegels des Serums (nach FANCONI)

Die Mobilisation des Calcium und des Phosphats erfolgt zunächst nach rein physikalischen Gesetzen durch Steigerung des Citrat- und Lactatgehaltes der interstitiellen Knochenflüssigkeit. Die Zitronen und Milchsäure bilden mit dem Calcium Komplexsalze, wodurch die Calciumionenkonzentration zurückgeht und damit auch das Produkt $A_{Ca++} \times A_{HPO_4--}$. Aber auch der feste inaktive Skelettanteil kann durch Parathormon angegriffen werden, und zwar im Sinne einer Osteoklasie, durch Umwandlung von Osteoblasten in Osteoklasten.[21/22/73]

Im Darm konnte im Gegensatz zum Calcium kein eindeutiger Einfluß des Parathormons auf die Phosphatresorption nachgewiesen werden.[16] FIRSCHEIN[23] hält allerdings auch die Wirkung auf die Calciumresorption für nicht wahrscheinlich.

Für die renale Phosphatregulation ist das Hormon jedoch ohne Zweifel ein wichtiger Faktor, und zwar fördert es die renale Calciumrückresorption und die Phosphatausscheidung, wobei bei letzterer noch offenbleiben muß, wie weit daran eine Hemmung der Rückresorption für Phosphat oder eine vermehrte Sekretion beteiligt sind.[21/22/46/53] Versuche von HARRISON[28] und JONXIS[41] geben Anhaltspunkte für die Vermutung, daß Vitamin D die Wirkung des Parathormons auf den Knochen und den renalen Tubulus beeinflußt, ja daß Parathormon ohne das Vorhandensein von Vitamin D gar nicht wirken kann. STEENDIJK[67] zeigte, daß bei Vitamin D-Mangelrachitis Calcium-und Phosphatspiegel im Serum nach alleiniger Zufuhr von Parathormon unbeeinflußt blieben.

Der Hauptangriffspunkt des Vitamin D ist der Darm, es steigert bei einer Avitaminose die Calciumresorption. NICOLAYSEN[52] konnte die Wirkung auch an der isolierten Darmschlinge nachweisen. Auch für die Resorption von Phosphat scheint Vitamin D ein wichtiger Faktor zu sein. Nach HARRISON und HARRISON[29] können Ratten mit Vitamin D-Mangelrachitis nicht das gleiche Konzentrationsgefälle für Phosphat im Darm aufrechterhalten wie gesunde Kontrolltiere. Die physiologische Bedeutung des Vitamin D für den Knochen wie auch sein Reaktionsmechanismus konnten bisher nicht völlig aufgeklärt werden. In vitro konnte kein Einfluß von zugesetztem Vitamin D auf die Mineralisation gefunden werden.

Bekannt ist auch eine Zitratvermehrung im venösen Blut des Knochens und im Blut nach Vitamin D-Gabe, deren Hauptaufgabe nach FANCONI[21] darin besteht, die höchst aktiven Calciumionen durch Bildung von Komplexsalzen zu inaktivieren, ohne daß dadurch die Ultrafiltrierbarkeit und damit die Beweglichkeit des Calciums verlorengeht.

Andererseits weiß man aus in vitro-Inkubationsversuchen mit Knochengewebe von rachitischen Ratten, daß die Menge des mobilisierten Ca^{++} etwa zehnfach größer ist, als das in der gleichen Zeit vom Gewebe gebildete Citrat.

Auch SCHACHTER[64/65] schreibt der Wirkung auf den Citratstoffwechsel eine wichtige Rolle zu, wenn er annimmt, daß die Wirkung des Vitamins auf aktiven Transport beruhe, der wiederum von einem oxydativen Metabolismus abhängig ist. HARRISON[27/28/30] gewann bei seinen Untersuchungen über den Transport von Calcium und Phosphat durch die Darmwand Anhaltspunkte dafür, daß Vitamin D eine Permeabilitätsvergrößerung der Mukosazellmembran zur Folge hat.(siehe auch SCHREIER[66]) Dies könnte sowohl den aktiven Transport als auch den Stoffwechsel beeinflussen. Eine weitere Funktion des Vitamins besteht in der Förderung der Aminosäurerückresorption in den Nierentubuli und eine Beeinflussung der Acidogenese. (JONXIS, FANCONI[21])

Schließlich sei noch auf Untersuchungen von NEUMAN[50], De PRA und NORDIO[58] hingewiesen, die enge Zusammenhänge zwischen Calcium-Phosphatstoffwechsel und oxydativer Phosphorylierung, KREBS - Cyclus und Steroiden vermuten. (Abb. 2)

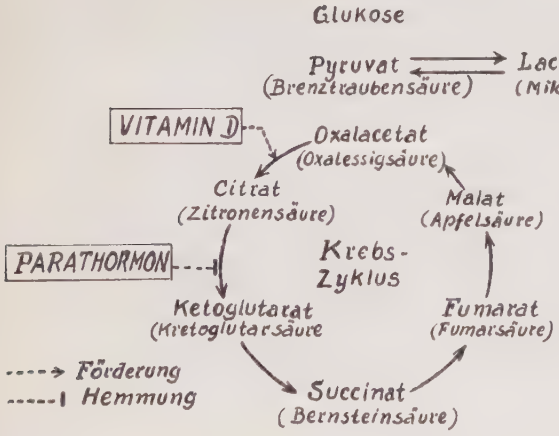

Abb. 2.
(nach NEUMAN)

III. Vitamin-D-Mangelrachitis und Pathogenese der Hypophosphatämie.

Obwohl bei der Rachitis die Veränderungen am Skelettsystem im Vordergrund des klinischen Bildes stehen, handelt es sich doch um eine allgemeine Stoffwechselstörung. Bei ausgeprägten Fällen ergibt sich eine charakteristische Konstellation: Das Plasmacalcium ist kaum, das Plasmaphosphat stark erniedrigt, die Calciumausscheidung im Harn vermindert, diePhosphatclearance vergrößert, der Phosphatausscheidungsindex und die alkalische Phosphatase im Plasma erhöht. Das Calcium-Phosphat-Produkt ist kleiner als normal.[55)]

Interessieren soll uns in diesem Rahmen nur die Erniedrigung des Serumphosphates, die als das "Leitsymptom" der Rachitis angesehen wird, welches allen anderen Stoffwechselveränderungen vorauseilt.

Erstmalig beschrieben wurde diese Veränderung bereits 1919 von IVERSEN-LENSTRUP[38)] und 1922 von GYÖRGY[26)]. Auch HOWLAND undKRAMER[35)] beobachteten 1921 bei allen Typen von Rachitis und Osteomalacie mit Ausnahme der mit Niereninsuffizienz einhergehenden eine Erniedrigung des Calcium-Phosphat-Produktes. (Die normale Relation mg% Ca / mg% P liegt bei 2 : 1) Es sei nebenbei darauf hingewiesen, daß Gründe dafür vorliegen, das das Ionenprodukt $Ca^3 \times PO_4^2$ die Verhältnisse besser repräsentiert als $Ca \times HPO_4$, NORDIN[55/56)] (Abb. 3)

Das Absinken des Calcium-Phosphat-Produktes in der das Osteoid umgebenden Gewebsflüssigkeit ist nach Ansicht der meisten Autoren für die mangelhafte Verkalkung des neugebildeten Knochens bei Rachitis und Osteomalacie verantwortlich. Diese Annahme stützt sich auf Versuche, die zeigen, daß der rachitische Knorpel der Ratte dut verknöchert, wenn man ihn in normales Serum oder in künstliches Milieu

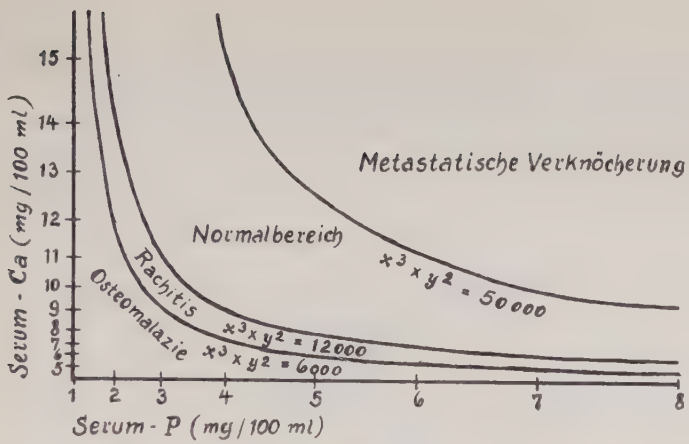

Abb. 3. Mutmaßliche Beziehung zwischen Serumcalcium und -phosphor bei Osteomalacie, Rachitis, beim Gesunden und bei metastatischer Verknöcherung.

Aus NORDIN, B.E.C., in: ASTWOOD, Clinical Endocrinologie, Band 1, New York (1960)

mit normalem Calcium-Phosphat-Produkt taucht, aber nicht verknöchert in rachitischem Serum oder einer Flüssigkeit mit niedrigem Calcium-Phosphat-Produkt.[79] Das niedrige Produkt in der Gewebsflüssigkeit wird durch einen Abfall der Calcium und Phosphatkonzentration verursacht, wobei aber der letzten proportional die größere Bedeutung zukommt.

Seit den grundlegenden Arbeiten von ALBRIGHT und REIFFENSTEIN[1] wurde die durch Vitamin D-Mangel gestörte intestinale Calciumresorption als der ursächliche Faktor angesehen, der die Parathyreoidea zu größerer Aktivität anregte, und der Befund der Hypophosphatämie eben als Zeichen des sekundären Hyperparathyreoidismus gedeutet, wodurch der Phosphatspiegel über eine Hemmung der tubulären Rückresorption gesenkt wurde. Auch NEUMAN[71] schrieb der Parathormonwirkung die entscheidende Rolle zu, indem es einerseits die Calcium- und Phosphatrückresorption im proximalen Tubulus fördern, im distalen Tubulus aber nur die Phosphatsekretion steigern sollte. Sind also hohe Phosphatclearance

und Hypophosphatämie bei der Rachitis die Folge einer Überfunktion der Parathyreoidea,und kann dieser Zustand durch Steigerung des Plasmacalciums behoben werden, wie in Untersuchungen von NORDIN und FRAZER[57] gezeigt werden konnte, so müßte die Erkrankung durch einen Mangel an Plasmacalcium bedingt sein. Allerdings ist es bisher noch nicht gelungen, die Krankheit durch eine calciumarme Diät zu induzieren.

An der Wirkung des Parathormons auf Knochen und Niere besteht heute kein Zweifel. Dennoch weisen eine Reihe neuer Ergebnisse darauf hin, daß an der Einstellung des Serumphosphatspiegels außer dem Parathormon noch andere Faktoren beteiligt sein müssen. So vertrat PHILPOT[61] die Meinung, daß der Anstieg des Serumphosphates während einer Calciuminfusion nicht als Zeichen der Blockade der Parathyreoidea (feed-back-mechanism) ausgelegt werden darf, weil er viel zu schnell erfolgte. Nach HOWARD[34] kann eine Hypercalciämie für sich allein, ohne Hormonwirkung, zu einem Anstieg des Serumphosphates führen, wie sich bei Patienten mit Hypoparathyreoidismus zeigen ließ.

Weiterhin mußte die Frage offen bleiben, warum zusätzliche Zeichen des Hyperparathyreoidismus, wie Osteoclastenanstieg im histologischen Knochenpräparat oder fibrotischer Markumbau, bei Rachitis sehr selten angetroffen werden.[68] Andere Autoren[36] sind allerdings der Ansicht, daß bei schwerer Vitamin D-Mangelrachitis wahrscheinlich oft auch Röntgen- und Knochenmarksbefunde zu finden seien, nur bisher kaum beachtet wurden.

Zur Rolle des Vitamin D ergaben, wie oben erwähnt, Versuche, die HARRISON[28] mit Ratten durchführte, daß bei Vitamin D-Mangel gleichzeitg eine, wenigstens vom funktionellen Gesichtspunkt gesehen, gesenkte Aktivität der Parathyreoidea vorhanden ist. Eine entsprechende Beobachtung wurde von JONXIS[41] beim Menschen gemacht. Infolge verminderten Ansprechens der Knochen- und Nierentubuluszellen auf das Parathormon gelangt die Parathyreoidea in den Zustand der Hyperaktivität, ohne jedoch imstande zu sein, den durch

Vitamin D-Mangel bedingten metabolischen Defekt zu kompensieren. Hieraus würde ohne weiteres verständlich, daß der durch Rachitis hervorgerufene sekundäre Hyperparathyreoidismus sich sowohl quantitativ wie qualitativ von der primären Form unterscheiden muß.

Die Tatsache, daß weniger der Calciumspiegel als vielmehr der Phosphatspiegel bei Rachitis erniedrigt ist, hat die Aufmerksamkeit auf eine mögliche Wirkung des Vitamin D auf die Niere gelenkt. So stellte HARRISON[28)] kürzlich die Hypothese auf, daß Vitamin D in geringen Dosen die Funktion des renalen Tubulus im Sinne einer Steigerung der Phosphatrückresorption beeinflussen könnte, möglicherweise durch Einflußnahme auf das System, welches empfindlich für Parathormon ist. Damit ergäbe sich eine vom Knochen unterschiedliche Wechselwirkung zwischen Parathormon und Vitamin D.

Die Rolle des Vitamin D für die Resorption im Darm von Calcium und Phosphat wurde bereits gestreift.

Aus der Kenntnis der vielfältigen, sich zum Teil widersprechenden Ergebnisse legt STEENDIJK[67/68)] der Pathogenese der Hypophosphatämie einen komplizierten Mechanismus zugrunde, in dem sowohl Parathormon als auch Vitamin D eine Rolle spielen, wobei noch ungeklärt bleiben muß, welche bei der Rachitis fehlende Wirkung des Vitamin D für das niedrige Calcium-Phosphat-Produkt verantwortlich zeichnet.

PROBLEMSTELLUNG

Die beobachtete Erniedrigung des Serumphosphatspiegels regte zu der Fragestellung an, ob ihr eine intrazelluläre Erniedrigung im Gewebe parallel gehe. Dem käme eine besondere Bedeutung zu, da die Kontrolle der mitichondralen Atmungsgeschwindigkeit durch anorganisches Phosphat und den Phosphatacceptor Adenosindiphosphat oft als die zelluläre Basis für die Regulation des Umsatzes des Organismus angesehen wird, LARDY[45]. Da in Arbeiten von STRÖDER, GARBE[25/70] wie auch von WILHELM[76] eine Verminderung des Adenosintriphosphates in Leber- und Nierengewebe nachgewiesen wurde, hätte man eine biochemisch interessante, einfache Ursache für die verschiedenen Effekte gefunden.

Die bisher in tierischen Geweben, insbesondere der quergestreiften Muskulatur, gefundenen Orthophosphatwerte liegen aber meist oberhalb des für das Funktionieren dieses Regelmechanismus geforderten Konzentrationsbereiches.[8/45] Eine Bestimmung des "wahren" Orthophosphates war mit den bisherigen Methoden nicht möglich, da bei diesen der Zerfall intrazellulär auftretender Phosphatester wie Adenosinphosphat und Phosphokreatin die Werte stark überhöht und eventuell auftretende Unterschiede verwischt.

In der vorliegenden Arbeit soll mit einer von WOLLENBERGER und Mitarbeitern[43/75] angegebenen Methode unter schonenden Bedingungen die Bestimmung der Phosphatkonzentration in der Leber bei rachitischen und mit Vitamin D geschützten Ratten durchgeführt werden. Gleichzeitige Bestimmung des Serumphosphates soll eine Korrelation ermöglichen.

Um einen Korrekturfaktor für den Extrazellulärraum des Gewebes zu erhalten, wurde einer Reihe von rachitischen und geschützten Tieren mit radioaktivem Jod markiertes Albumin injiziert. Anschließend wurde die Gewebsentnahme in der gewohnten Art vorgenommen.

METHODIK

I. Rachitiserzeugung und Haltung der Versuchstiere.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden an rachitischen Ratten und Kontrolltieren durchvorgenommen.+ Und zwar wurden die Jungtiere im Alter von 25 Tagen von den Vitamin-D-arm ernährten Müttern getrennt und anschließend mit einer von Mc COLLUM [11] angegebenen Diät (nr. 3143) gefüttert. Die Diät wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

In 12 Liter Wasser werden aufgekocht:

1584 g Maisschrot,
1584 g Weizenschrot,
720 g Weizenkleber,
720 g Gelatine,
144 g Calciumcarbonat,
48 g Kochsalz.

Jedes Versuchstier erhielt pro Tag einen Nahrungswürfel von 35 - 40 g Diät und zusätzlich zur Substitution etwa 5 - 10 g Karotten. Die vorgesehenen Vergleichstiere erhielten nach Absetzen vom Muttertier die gleiche Nahrung, wurden aber geschützt, indem ihnen täglich 40 I.E. Vitamin D_3 in 0,1 ml Olivenöl gelöst mit Hilfe der Schlundsonde verabreicht wurden. Die rachitischen Tiere erhielten 0,1 ml reines Olivenöl auf die gleiche Art.

Die Tiere wurden in Einzelgläsern auf Torfmull gehalten, täglich auf etwaige krankheitszeichen hin beobachtet und morgens nüchtern gewogen. Tiere, deren Aussehen oder Verhalten auf eine Krankheit schließen ließ, oder die eine unregelmäßige Gewichtskurve aufwiesen, wurden eliminiert.

+ An dieser Stelle möchte ich dem Forschungs- und Untersuchungsinstitut für Milchvitaminierung in Frankfurt a. M. für die Überlassung der Tiere und die Durchführung der Röntgenkontrollen herzlich danken.

Zur Regulierung der Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden ein elektrischer Heizlüfter sowie ein mit einem Hygrometer gekoppelter Verdunster installiert. So wurde die Luftfeuchtigkeit konstant bei 65 - 7o % gehalten bei einer Raumtemperatur von 26 - 28°C.

Zur Beurteilung des Schweregrades der Rachitis wurden vor und nach den Versuchen Röntgenaufnahmen des Kniegelenkes hergestellt. Man hat die Weite des Femurepiphysenspaltes am Kniegelenk als Maß für den Krankheitsgrad eingeführt, wobei der Wert "0" mit sehr weitem Epiphysenspalt am Kniegelenk eine ausgeprägte Rachitis und der Wert "10" mit ganz schmalem Spalt einen von der Krankheit unbefallenen gesunden Knochen charakterisieren soll, BEKEMEIER.[5)]

Die für den Versuchstag vorgesehenen Tiere blieben morgens nüchtern. Es wurden an einem Tage meistens jeweils zwei rachitische und gesunde Ratten operiert.
(Korrelation Serumphosphat - Röntgengrad : Abb.7)

II. S e r u m p h o s p h a t b e s t i m m u n g

Nach Wirksamwerden der Äthernarkose wurde mit einem schnellen, schrägen Schnitt die erwärmte Schwanzspitze des Tieres gekappt, die ersten Tropfen des hervorquellenden Blutes verworfen und der Rest vermittels einer Kapillare im Zentrfugenröhrchen aufgefangen (4oo/ul). Die Werte wurden jeweils doppelt abgenommen und angesetzt. Die gleich anschließende Serumphosphatbestimmung wurde mit Hilfe der Microanalyse[+] nach einer modifizierten Methode nach FISKE und SUBBAROW[24)] durchgeführt, der folgendes Prinzip zu Grunde liegt :

[+]BECKMAN / SPINCO Ultramikroanalysensystem Modell 15o

Die Serumproteine werden mit Trichloressigsäure gefällt, und das proteinfreie Filtrat wird mit Molybdänsäure behandelt. Die gebildete Phosphormolybdänsäure wird mit Aminonaphtolsulfonsäure reduziert und bildet einen blauen Molybdänkomplex.

Die Intensität des blauen Farbstoffes ist proportional dem Gehalt an anorganischem Phosphat im vorliegenden Serum.
(Ergebnisse: Tabelle 5/6)

III. Untersuchungen zum Säure-Base-Haushalt

Verwandt wurde das nach dem Kupieren der erwärmten Schwanzspitze ausströmende arterielle Blut, das in heparinisierten Kapillaren aufgefangen wurde. Die Bestimmung des aktuellen pH, des aktuellen pCO_2 und des Basenüberschusses erfolgte nach einem Microverfahren, das 1960 von ASTRUP und Mitarbeitern [2/3] angegeben wurde.+

Prinzip: Die Technik der Bestimmung der Säure-Base-Werte beruht auf dem Äquilibrierprinzip. Die graphische Darstellung der Beziehungen zwischen log pCO_2 und pH ergibt, wenigstens für praktische Belange, eine gerade Linie. Die Steigung dieser Geraden hängt von der Pufferkapazität des Blutes ab. Durch Äquilibrieren einer Blutprobe bei zwei bekannten CO_2-Drucken und Messen der pH-Werte wird die Gerade für eine Probe bestimmt. Ist der tatsächliche pH der Blutprobe bekannt, dann kann der tatsächliche pCO_2 ermittelt werden. Wird dem Blut gebundene Säure zugesetzt, wird die Linie nach links verschoben, wird Base zugesetzt, wird die Linie nach rechts verschoben.

Jetzt kann eine Kurve konstruiert werden, die unab-

+Gerät: ASTRUP Micro equipment, Fa.: Radiometer -Copenhagen

hängig von der Hämoglobinkonzentration, die durch eine beliebige Menge Säure oder Base verursachte Verschiebung ausdrückt.

Der Schnittpunkt zwischen dieser Kurve und einer gefundenen pH / log pCO_2 - Linie für eine Blutprobe zeigt somit den Base-Überschuß pro Liter Blut in milli-Äquivalenten an. (Abb. 4)
(Ergebnisse: Tabelle 3/4)

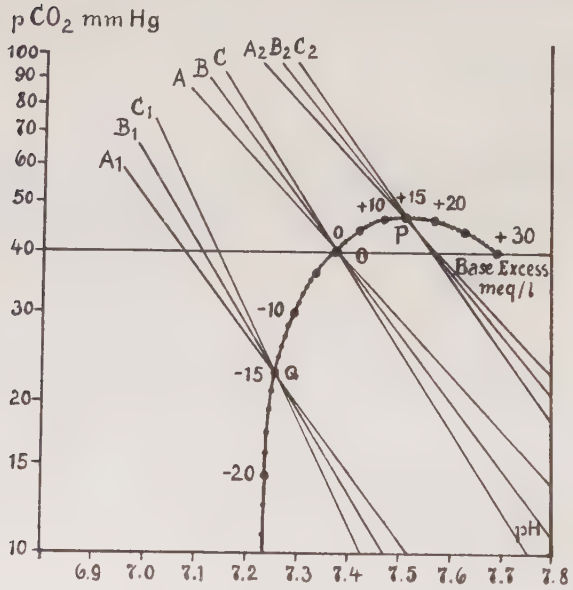

Abb. 4. Verschiebung der logCO_2 pH - Kurven bei Hinzufügung von 15 mÄq Säure und Base, beziehungsweise pro Liter Blut. (nach ASTRUP)

Fräulein Passon, Kinderklinik Würzburg , danke ich herzlich für die praktische Durchführung der Serumphosphatbestimmungen sowie die Ermittlung der Säure - Basenwerte.

IV. Phosphatbestimmung im Gewebe

Methode nach WAHLER, WOLLENBERGER und KRAUSE [43/75].

1. Narkose und Gewebsfixierung

Die Versuchstiere wurden abweichend von der angegebenen Methode[43] mit Äther narkotisiert und erhielten während der Operation ein Luft-Sauerstoffgemisch. Es wurde darauf Wert gelegt, daß die Tiere auch unter der Narkose gleichmäßig atmeten und keinerlei cyanotische Zeichen auftraten.

Nach der Blutabnahme aus dem Schwanz zur Serumphosphatbestimmung und Ermittlung der Säure-Base-Werte wurde die Bauchhöhle rasch eröffnet und jeweils der linke Leberlappen mit einer in flüssigem Sauerstoff vorgekühlten "Gefrierstopzange" in situ fixiert und die 1,5 - 2 mm dicken gefrorenen Scheiben mit dem Skalpell vom übrigen Gewebe getrennt. Die Proben wurden bis zur weiteren Aufbereitung in flüssigem Sauerstoff aufbewahrt.

2. Aufbereitung der Gewebsproben

Die Weiterverarbeitung bis zur Extraktion erfolgte im Kühlraum (2°C). Die Proben wurden nun unter ständigem Zugießen von flüssigem Sauerstoff in vorgekühlten Porzellanmörsern zu feinem Pulver zerrieben, anschließend auf einem tarierten Papier ohne wesentliches Erwärmen mittels einer Analysenwaage rasch gewogen und in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt.

3. Extraktion des Gewebspulvers

Reagentien und Herstellung:

11,7 M Methanol (4o Gew.%)	= 474,5 ml Methanol p.a./1	(Fa. MERCK)
0,00125 M EDTA, pH 7	= 465,3 mg EDTA-Dinatriumsalz /1.	(Fa. MERCK)
70 %ige $HClO_4$		(Fa. MERCK)

Die Extraktion der Phosphatfraktion erfolgte bei einer Temperatur von -35°C. Die Trockenkammer einer Gefrier-

trockenanlage[+] wurde als Kühlbad verwendet, als Kühlmittel diente eine 52,5 Vol %ige Aethylenglycollösung (Fa. MERCK). Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Kältethermosthaten konstant gehalten.

Ohne Rücksicht auf die tatsächliche Gewebsmenge (3oo-6oo mg) wurde jede Probe in 8 ml Extraktionslösung (Methanol-EDTA-Gemisch) gegeben und die suspendierten Gewebspartikel 3-5 sec in einem hochtourigen Homogenisator[++] nachbehandelt. Anschließend wurde 1o min bei -35°C und 22ooo g = 185oo U/min im Winkelrotor[+++] zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und im Kühlbad bei -35°C aufbewahrt. Nach zweimaligem Nachextrahieren in derselben Weise mit 2 ml Extraktionslösung wurden die Überstände vereinigt und wegen der großen Phosphatmenge auf 18,6 ml Extraktionslösung aufgefüllt.

Zur Enteiweißung diente 1,4 ml 7o%iges $HClO_4$; die nach dem Durchmischen entstandene Trübung wurde abzentrifugiert (8 min bei 22ooo g und -1o°C).

Die klaren, farblosen Überstände wurden abgegossen und bis zur weiteren Verwendung im Eisbad bei 0°C gehalten.

Unter diesen schonenden Bedingungen sollte sichergestellt werden, daß bei der Gewebsentnahme und -extraktion kein Orthophosphat zusätzlich aus labilen Bindungen (Phosphokreatin, Adenosintriphosphat) freigesetzt und somit das tatsächliche Orthophosphat des Gewebes überschätzt wurde.

Die mit neutralem wässsrigem Methanol bei -35°C extrahierte Orthophosphatfraktion stellt wahrscheinlich das wahre Otthophosphat des Lebergewebes dar oder kommt ihm mengenmäßig sehr nahe[43].
(Berücksichtigung des Extrazellularraumes siehe unten)

[+] Gefriertrockenanlage Typ Delta, Fa. M. Christ, Osterode.
[++] Ultra-Turrax, Modell TP 18/2, Typ-Nr. oo2, 24ooo U/min, Fa. Janke & Kunkel, Staufen i.Br.
[+++] Laborzentrifuge Universal Junior III KS, Fa. M. Christ, O.

4. Phosphatanalyse

Verfahren B der Methode von WAHLER und WOLLENBERGER[75)]

Prinzip:

Die Grundreaktion dieser Bestimmung besteht in der Bildung eines Dodekamolybdatophosphorsäure-Komplexes, der in saurer Lösung zur Bildung folgenden Gleichgewichtes führt:

$$12\ MoO_4^{--} + H_3PO_4 + 24\ H^+ \rightleftharpoons H_3PMo_{12}O_{40} + 12\ H_2O$$

Die Einstellung dieses Gleichgewichtes ist abhängig von 1. der Wasserstoffionenkonzentration, 2. der Molybdatkonzentration, 3. der Reaktionszeit und 4. der Reaktionstemperatur.

Ein schneller und weitgehend vollständiger Reaktionsablauf ist bei einem pH unter 2,o und hohem Molybdatüberschuß durch Extraktion des Dodekamolydatophosphates mittels organischer Lösungsmittel zu erreichen. Zur Vermeidung jeglichen katalytischen Einflusses der Wasserstoffionen wird bei einer Reaktions- und Extraktionstemperatur von 0°C gearbeitet.

Der sich in der organischen Phase befindliche Phosphomolybdatkomplex wird durch Zusatz von festem Zinn-(II)-chlorid, welches die höchsten bisher erhaltenen Farbstoffausbeuten liefert, reduziert und photometrisch bestimmt. Die Farbintensität hat ein Maximum bei 71o m/u (siehe Spektrum, Abb. 5) und ist zwischen 15 - 3oo min nach Zugabe konstant. Die Verdunstungsgeschwindigkeit der organischen Phase läßt sich durch Zusatz von Methyl- oder Äthylcellosolve herabsetzen, (siehe auch Abb. 6)

In Abwandlung des Verfahrens B wurde nach Angabe der Autoren zur Extraktion des Phosphomolybdatkomplexes nicht Isopropylacetat sondern für die methanolhaltigen Extrakte ein Gemisch von Di-n-Butyläther, n-Propanol und Äthylpropionat im Verhältnis 1 : 2 : 2 verwendet.

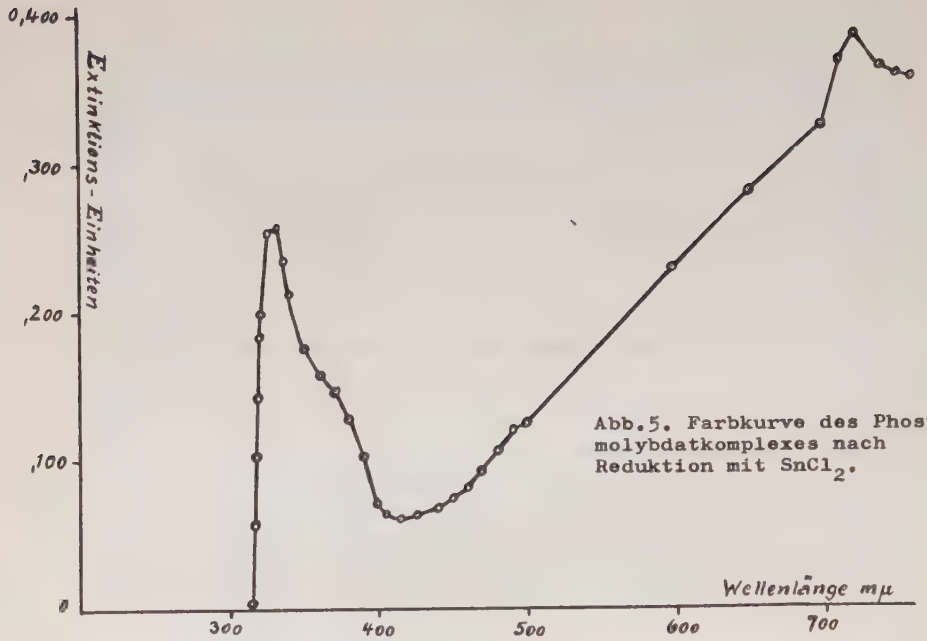

Abb.5. Farbkurve des Phosphomolybdatkomplexes nach Reduktion mit $SnCl_2$.

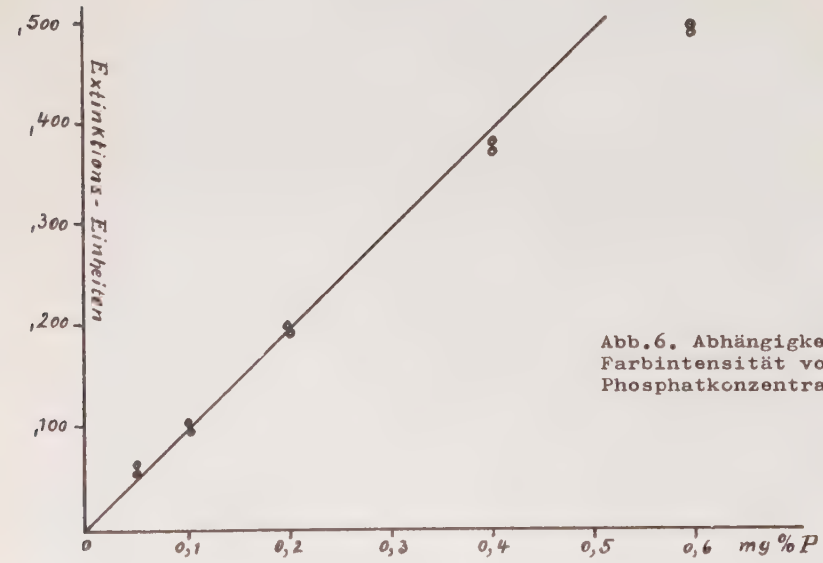

Abb.6. Abhängigkeit der Farbintensität von der Phosphatkonzentration.

Analysengang:

Alle verwendetwn Reagentien und Pipetten wurden im Eisbad oder Kühlschrank vorgekühlt.

Es wurden jeweils doppelt angesetzt:

a) Proben der rachitischen Tiere,

b) Proben der geschützten Tiere,

c) Phosphatstandartlösungen,

d) Blindlösungen.

Nun wurden in die einzelnen Reagenzgläser (1o ml JENAER-Reagenzgläser mit fest sitzendem Plastikstopfen) nacheinander pipettiert :

3,o ml o,oo5 Mol Na_2MoO_4 (1,2o98 g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) (Fa. MERCK)

4,o ml Extraktionsgemisch bestehend aus:
1 Teil Di-n-Butyläther (Fa.SCHUCHART)
2 Teilen n-Propanol (Fa.MERCK p.Chr.)
2 Teile Äthyl-propionat- (Fa.SCHUCHART, destilliert!)

Dann wurden rasch hinzugegeben :

1,o ml Probelösungen,

Phosphatstandartlösungen (o,2 mg %P in o,5 n $HClO_4$)

Blindlösungen a) o,5 n $HClO_4$
b) 18,5 ml Extraktionslösung + 1,4 ml 7o %ige $HClO_4$

Die zweite Blindlösung ergab manchmal eine um o,oo3-o,oo5 höhere Extinction.

Nach dem Zusammenmischen wurde der Stopfen fest aufgesetzt und sofort 3o sec kräftig in der Längsrichtung geschüttelt und die Phasen durch 1o sec Zentrifugieren in der Winkelzentrifuge[+] getrennt. Dann wurden sofort 2,5 ml der organischen Phase (oben) mit der Pipette (Peleusball) entnommen, mit 1,5 ml Cellosolve (Monoäthyl-Glycoläther, Fa. MERCK) versetzt und mit 2oo mg $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (MERCK) angefärbt.[++]

[+] AHT-Laborzentrifuge

[++] Zinn-(II)-chlorid darf nicht zu lange an der Luft stehen wegen Oxydationsgefahr und Bildung von weißem Niederschlag von SnO_2-hydrat in der Küvette !

Die Analyse der organischen Phase erfolgte bei Zimmertemperatur.

Nachdem das Zinn-(II)-chlorid durch Umschütteln völlig gelöst war, konnten die Extinktionen nach frühestens 15 min am EPPENDORF-Photometer bei 691 m/u gegen Cellosolve abgelesen werden.

Berechnungsformel :

$$\frac{S \times 1000 \times E_P \times \text{Verd.} \times V_E}{E_S \times 100 \times G \times 30{,}98} = \text{/uMol Phosphat/g Frischgewicht.}$$

E_P = Extinktion der Probe
E_S = Extinktion des Standards
S = Phosphatgehalt (mg%) der Standardlösung
V_E = Volumen des Extraktionsmittels
G = Einwaage der Gewebsprobe in g
Verd= Verdünnung bei Messung

Die Extinktionen wurden nach dem Blindwert korrigiert:
Extinkt. Standard korr. = $\triangleq$E Standard - $\triangleq$E $HClO_4$
Extinkt. Probe korr. = $\triangleq$E Probe - $\triangleq$E Extraktionslösung

NB! Eventuell auftretende Küvettendifferenzen wurden berücksichtigt.

V. Bestimmung des Extrazellulärraumes (Plasmaraum)

Unter der Annahme, daß ein Stoff nicht in die Zellen eindringt und im Extrazellulärraum gleichmäßig verteilt ist, ließe sich die Größe dieses Raumes aus der Gehaltsbestimmung dieses Stoffes im Gewebe und im Blutplasma errechnen. Es gilt die folgende Beziehung:

$$Vol._{Extraz.} : Vol._{Gewebe} = Konzentr._{Gewebe} : Konz._{Plasma}$$

Das hier verwendete Jodalbumin-J-131 war in physiologischer Kochsalzlösung gelöst mit einer spezifischen Aktivität von 44 /uC/mg Albumin.

Etwa o,1 ml Jodalbuminlösung wurde den Tieren (rachitische und Kontrolltiere) unter leichter Äthernarkose in eine Schwanzvene infundiert. Nach etwa einer halben Stunde (nach gleichmäßiger Verteilung im ganzen Körper) wurde den Tieren die Leber in der üblichen Weise entnommen und gleichzeitig durch Herzpunktion Blut gewonnen. Nach Abtrennung der Erythrocyten durch Zentrifugieren wurden jeweils o,1 ml Blutplasma im Plastikröhrchen zur Messung der Radioaktivität pipettiert. Die Gewebsproben wurden noch in gefrorenem Zustand gewogen und zur Messung ebenfalls in Plastikröhrchen überführt.

Messung der Radioaktivität

Zur Messung der Radioaktivität des J-131 stand ein Gerät der Firma PACKARD mit Bohrlochkristall-Scintillationsdetektor, Impulshöhenanalysator und automatischem Zähler+ zur Verfügung.. Die Proben wurden mit 1o min Zählzeit hintereinander gemessen, um eine korrektur für die kurze Halbwertzeit des J-131 (8,o5 Tage) zu vermeiden.
Aus der gemessenen Impulszahl/Minute/ml wurde der prozentuale Anteil des Plasmaraumes im Lebergewebe errechnet.

+ Tri Carb Auto-Gamma-Spektrometer, Fa. PACKARD.

VI. S t a t i s t i s c h e A u s w e r t u n g

Zur Charakterisierung einer Häufigkeitsverteilung sind zwei Größen notwendig :[63]

1. Der Mittelwert $\bar{x}$ bei einer Normalverteilung als arithmetisches Mittel der Summe der Einzelwerte x_i :

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

2. Die Standardabweichung s zur Beurteilung der Streuung von Einzelwerten um das arithmetische Mittel $\bar{x}$:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Hierbei sind: x_i = Einzelwert
N = Zahl der Einzelwerte

Die Wahrscheinlichkeit für die Nullhypothese gibt die Wertigkeit des Unterschiedes der Mittelwerte zweier Kollektive (rachitisch-gesund) im Vergleich zu zufälligen Abweichungen an (Signifikanz p)[63].
Zur Prüfung der Existenz solcher Unterschiede quantitativer Art wurde der sogenannte "t-Test" und für t die Signifikanzschranken der STUDENT-Verteilung für das einfache Integral p verwendet.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_{x_1} + S_{x_2}}{N_1 - N_2 - 2} \cdot \frac{N_1 + N_2}{N_1 \cdot N_2}}}$$

Hierbei sind: $\bar{x}_1$ = Mittelwerte der gesunden Tiere
$\bar{x}_2$ = Mittelwerte der rachitischen Tiere
S_x = Differenzenquadrat: $\sum (x_i - \bar{x})^2$

Die "p"-Werte für die errechneten "t"-Werte (bei einem Freiheitsgrad von $N_1 + N_2 - 2$) wurden aus Tabellen entnommen.[19]
Die 5% Grenze ($p \leq 0{,}05$) wurde als statistisch signifikant angenommen.

Zur Formulierung der Beziehung zwischen den beiden Variablen Serumphosphat (= Erwartungswert = x-Achse) und Leberphosphat (= Beobachtungswert = y-Achse) wurde eine Korrelation aufgestellt. Unter der Vorraussetzung, daß eine lineare Beziehung besteht, lassen sich zwei Regressionsgeraden errechnen, die einerseits durch den Schnittpunkt a der Geraden mit der y-Achse und andererseits durch die Steigung b charakterisiert sind.[63]

Die Regressionsgeraden wurden nach folgenden Formeln berechnet :[19]

(1) $$S_{xy} = \sum x\,y - \frac{\sum x \sum y}{N}$$

(2) $$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

(3) $$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{N}$$

Die Steigungen der Geraden errechnen sich :

(4) $$b_{yx} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad \text{und} \quad b_{xy} = \frac{S_{xy}}{S_{yy}}$$

(5)
$$G_I : (y - \bar{y}) = b_{yx}(x - \bar{x})$$
$$G_{II} : (y - \bar{y}) = \frac{1}{b_{xy}}(x - \bar{x})$$

Der Korrelationskoeffizient r drückt die Beziehung zwischen x und y durch eine einzige Zahl aus :

$$(6) \qquad r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

Liegt eine positive Korrelation vor, so strebt r gegen $+ 1$. Bei negativer Korrelation nähert sich r dem Wert -1. Bei völligem Fehlen einer Korrelation zwischen x und y wird $r = 0$.

VORVERSUCHE

I. D i e N a r k o s e

KRAUSE und WOLLENBERGER[43] verwendeten in der von Ihnen angegebenen Methode eine Barbituratnarkose. Und zwar wurden ausgewachsenen Meerschweinchen 2,5 ml Diallylbarbitursäure (1o%) und Urethan (4o%/kg) intraperitoneal verabreicht. Bei erwachsenen Kaninchen wurden o,5 ml 4o%ige Allylisopropylbarbitursäure/kg gespritzt. Die Tiere wurden künstlich beatmet.

Da diese Narkose die Möglichkeit einer exakten Dosierung bot, schien sie zunächst auch für unsere Versuche mit Ratten geeignet zu sein. Die günstigste Dosierung wurde in einer Versuchsreihe mit steigenden Konzentrationen ausgetestet. Hierbei zeigte sich, daß bei einem Durchschnittsgewicht der Versuchstiere von 8o g o,5 ml einer 2o%igen Somnifenlösung ausreichten (die oben erwähnten Narkotika standen nicht zur Verfügung), um die Tiere nach maximal 1o min völlig zu entspannen. Allerdings wurden in etwa 3o% der Fälle Anzeichen einer Cyanose beobachtet. Diese ließen sich durch geringere Konzentrationen des Narkotikums unter Umständen vermeiden, dann aber erhöhte sich die Entspannungszeit auf über 2o min.

Angesichts der ohnehin schon bekannten labilen Stoffwechsellage bei rachitischen Ratten[69] und der Schwierigkeit, bei so kleinen Tieren eine künstliche Beatmung exakt durchzuführen, muß diese Spanne, in welcher der Stoffwechsel der Tiere kaum beeinflußt werden kann, bedenklich lang erscheinen. Die früher häufig verwendete Äthernarkose ist dagegen sehr schnell wirksam, cyanotische Zeichen treten bei vorsichtiger Dosierung nur selten auf.

Zur Objektivierung dieser Beobachtungen wurden die Säure-Basewerte einer Reihe junger Ratten aus dem Tierstall

der Klinik jeweils unter Somnifen- und Äthernarkose überprüft. Somnifen (2o%ig) wurde in einer Dosierung von o,5 ml intraperitoneal appliziert.

Die Äthernarkose wurde in einem geschlossenen Topf mit Hilfe eines Äther-getränkten Wattebausches vorgenommen. Die Ergebnisse zeigen die folgenden Tabellen 1 und 2.

Nr.	akt. pH	pCO_2	BÜ	Stand. Bicarb.
1	7,345	34,2	-5,2	19,1
2	7,391	33,3	-3,9	21,o
3	7,375	33,5	-5,1	2o,o
4	7,433	41,5	-4,5	2o,5
$\bar{x}$	7,386	35,6	-5,3	2o,1

Tabelle 1. Säure-Basestatus unter Äthernarkose.

Nr.	akt. pH	pCO_2	BÜ	Stand. Bicarb.
5	7,251	31,7	-12,1	14,4
6	7,27o	39,o	-8,8	17,4
7	7,256	4o,o	-9,1	17,2
8	7,249	45,9	-7,3	18,3
$\bar{x}$	7,256	39,1	-9,3	16,8

Tabelle 2. Säure-Basestatus unter Somnifennarkose.

akt. pH = aktuelle Wasserstoffionenkonzentration
BÜ = Basenüberschuss
Stand. Bicarb. = Standard Bicarbonat

Es zeigte sich, daß alle mit Somnifen narkotisierten Tiere eine stärkere, sicherlich metabolisch bedingte Acidose (hoher Basenüberschuß) aufwiesen, als die mit Äther betäubten Vergleichstiere. Gleichzeitig durchgeführte Orthophosphatbestimmungen des Lebergewebes ergaben so große Schwankungen, daß eine Angabe hier sinnlos wird.

Auf Grund dieser Ergebnisse schien es ratsam, bei allen weiteren Versuchen den Ätherrausch der Barbituratnarkose vorzuziehen. Daß auch dies keine ideale Lösung darstellt, geht schon aus Versuchen von KOCSIS[42] hervor, die bei rachitischen Ratten unter Ätherinhalation ein Absinken der Puls- und Atemfrequenz beobachtete, das 6o - 8o sec andauerte, statt 3o - 4o sec bei gesunden Tieren. Die mögliche Stoffwechselbeeinflussung liegt auf der Hand.

II. W e r t e v o m H e r z m u s k e l d e s H u n d e s

KRAUSE und WOLLENBERGER[43] bestimmten den Phosphatgehalt in Extrakten des Myocards gesunder, künstlich beatmeter Meerschweinchen und des Skeletmuskels von Kaninchen. Sie fanden für das Myocard Werte von 1,7 uMol Orthophosphat / g Frischgewebe, für den Skeletmuskel Werte, die je nach Stoffwechsellage zwischen 5,o6 und 2o,6 uMol lagen.

Da es aus technischen Gründen nicht möglich war, Meerschweinchen künstlich zu beatmen, wurde ein Hund operiert. Für den in situ mit der "Gefrierstopzange" fixierten Herzmuskel wurden Werte um 2,8 uMol / g Gewebe gefunden. Hier zeigte sich wieder die Überlegenheit der "Gefrierstopmethode" gegenüber den üblichen Entnahmeverfahren: gleichzeitig von demselben Tier mit dem Skalpell entnommene Proben ergaben einen wesentlich höheren Orthophosphatgehalt um 4,4 uMol / g Gewebe.

III. Leberwerte bei Normaltieren

Zur Prüfung der Methode wurden eine Anzahl von Leberwerten von Ratten aus dem Tierstall der Klinik angefertigt. Die gefundenen Werte schwankten in weiten Grenzen zwischen 3,35 und 5,7 /uMol/g Frischgewebe, eine Tatsache, die allerdings angesichts der unkontrollierten Nahrungsaufnahme und der uneinheitlichen Lebensbedingungen der Tiere nicht verwunderte. Die meisten Werte lagen um 5 /uMol/Phosphat/g Gewebe und passten somit gut zu den später gefundenen der Kontrolltiere.

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Methode wurden von demselben Leberpräparat mehrere Proben angesetzt. Es ergaben sich Abweichungen zwischen 1 und 2%.

ERGEBNISSE

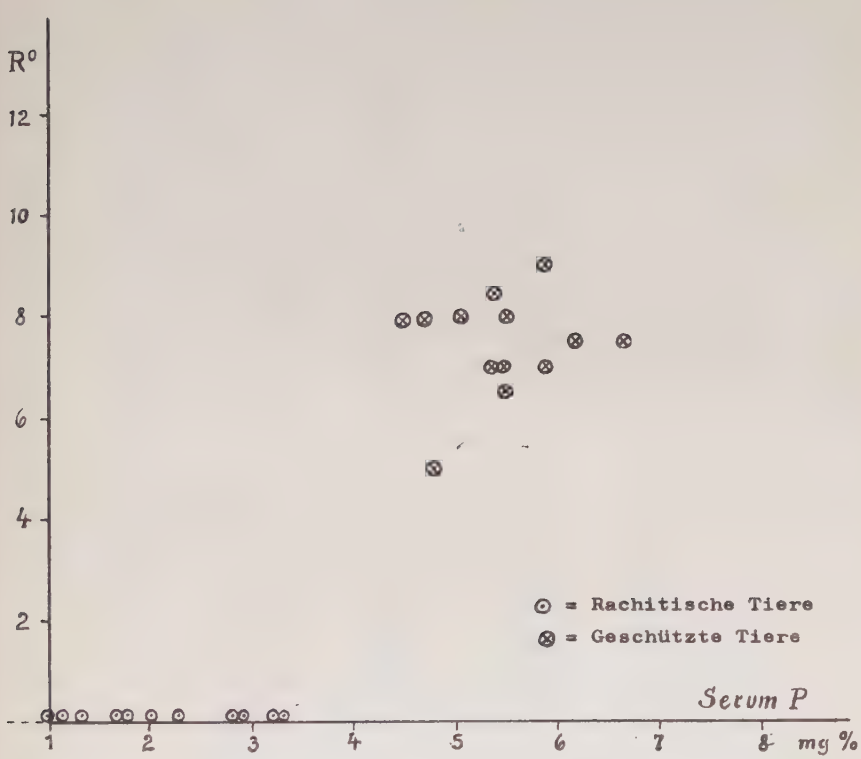

Abb.7. Korrelation: Serumphosphat - Röntgengrad (siehe oben).

Die röntgenologische Untersuchung des Kniegelenkes ergab für alle rachitischen Tiere (Serumphosphat < 4) einen Röntgengrad von 0.

Alle erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 3 - 6 zusammengefaßt dargestellt.

Rachitische Tiere:

Nr.	Geschl.	R^o	pH	pCO_2	BÜ
1	♀	o	7,262	63,2	-3,5
2	♂	o	-	-	-
3	♀	o	7,176	59,8	-6,2
4	♀	o	7,26o	63,o	-1,9
5	♀	o	7,231	48,5	-5,2
6	♀	o	7,26o	57,o	-5,8
7	♀	o	7,281	52,3	-2,7
8	♂	o	7,295	39,9	-7,o
9	♂	o	7,333	44,8	-o,5
1o	♂	o	7,389	36,o	-2,1
11	♂	o	7,311	4o,1	-6,o
12	♂	o	7,11o	66,6	-7,9
13	♀	o	7,22o	45,5	-7,8
14	♀	o	7,235	48,8	-6,2
15	♂	o	7,229	56,2	-4,1
$\bar{x}$:	-	o	7,2566	51,6	-4,7
s :	-	o	o,214	9,69	2,33

Tabelle 3.: Säure-Basestatus der rachitischen Tiere.

R^o : Röntgengrad
pH : Wasserstoffionenkonzentration
pCO_2: Kohlendioxyddruck in mm Hg
BÜ : Basenüberschuß in mäq./Liter
$\bar{x}$: Mittelwerte s : Standardabweichung

Geschützte Tiere:

Nr.	Geschl.	R°	pH	pCO_2	BÜ
1	♀	8,5	7,3o2	52,8	-2,6
2	♂	7,o	7,222	55,3	-5,5
3	♂	8,o	7,167	65,3	-6,o
4	♂	9,o	7,2o3	63,8	-3,2
5	♀	8,o	7,268	53,1	-2,3
6	♀	8,o	7,331	44,1	-2,6
7	♂	5,o	7,188	68,9	-3,2
8	♀	7,5	7,285	57,o	-5,o
9	♀	7,5	7,241	5o,9	-4,1
1o	♀	8,o	7,39o	44,2	+1,8
11	♀	7,o	7,42o	41,8	+2,8
12	♂	6,5	7,413	41,o	+2,o
13	♀	7,o	7,338	42,1	-2,3
14	♀	7,o	7,317	51,9	±o
15	♀	8,o	7,261	57,2	-3,8
$\bar{x}$:	-	7,4	7,317	52,63	-2,2
s :	-	o,953	o,127	8,89	2,77

Tabelle 4.: Säure-Basestatus der geschützten Tiere.

Beim statistischen Vergleich der Mittelwerte ("t-Test") wurde für p gefunden:

p : pH = $o,2o \geq p > o,15$

pCO_2 = $o,o4 > p > o,35$

BÜ = $o,o1 > p > o,oo5$

Rachitische Tiere:

Nr.	Serum-Phosphat		Leber-Phosphat	
	mg%	uMol/g	Gehalt uMol/g	Intraz.
1	1,7	o,53	5,4o	6,391
2	2,o	o,63	3,28	3,819
3	3,2	1,o1	4,37	5,o53
4	1,2	o,38	4,79	5,687
5	o,34	o,11	6,7o!	8,o4o
6	3,34	1,o5	4,o2	4,623
7	1,82	o,57	4,83	5,696
8	1,o	o,31	3,47	4,112
9	2,8	o,88	4,9o	5,717
1o	2,9	o,91	3,9o	4,5o8
11	2,3	o,72	4,92	5,774
12	2,1	o,66	4,57	5,365
13	2,o	o,63	4,78	5,624
14	2,o	o,63	4,86	5,72o
15	1,3	o,41	4,71	5,585
$\bar{x}$	2,o	o,63	4,63	5,447
s	o,836	o,263	o,816	1,oo6

Tabelle 5.: Ergebnisse der Phosphatbestimmungen der rachitischen Tiere.

Geschützte Tiere:

Nr.	Serum-Phosphat		Leber-Phosphat	
	mg%	/uMol/g	Gehalt /uMol/g	Intraz.
1	5,4	1,7o	5,83	6,669
2	5,5	1,73	5,714	6,518
3	4,5	1,42	5,77	6,654
4	5,9	1,86	4,59	5,145
5	5,o8	1,6o	5,15	5,872
6	4,5	1,42	5,37	6,173
7	4,8	1,51	5,o9	5,816
8	6,2	1,95	5,18	5,836
9	6,7	2,11	6,15	6,971
1o	4,7	1,48	5,o2	5,74o
11	5,5	1,73	5,o1	5,677
12	5,5	1,73	5,24	5,953
13	5,4	1,7o	6,23	7,163
14	5,9	1,86	5,oo	5,639
15	5,5	1,73	5,38	6,122
$\bar{x}$	5,41	1,7o	5,38	6,129
s	o,623	o,195	o,464	o,557

Tabelle 6.: Ergebnisse der Phosphatbestimmung der Vitamin-D-geschützten Tiere.

Der statistische Vergleich der Mittelwerte ergab:

p : Serum-Phosphat = o,ooo5 > p

Leber-Phosphat-Gehalt = o,oo25 > p > o,ooo5

Leber-Phosphat-Intraz. = o,o25 > p > o,o125

Der Orthophosphatgehalt der Leber der geschützten Tiere ergab sich zu 5,38 /uMol/g Leber.
Die letzten uns bekannten Ergebnisse bei Rattenlebern berichtete WILHELM.[76] Er gab einen Wert von 24 mg% Phosphor an (= 7,75 /uMol/g).
Der hier gefundene Wert liegt eindeutig niedriger, was bei der von uns angewandten Methode zu erwarten war. WILHELM gibt jedoch für rachitische Tiere einen höheren Wert an: 28 mg% Phosphor = 9,1 /uMol/g. Dieses paradoxe Ergebnis, daß der Orthophosphatgehalt in der rachitischen Leber höher sein soll als in der Leber gesunder Tiere, können wir nicht bestätigen. Wir fanden einen Wert von 4,63 /uMol/g Leber im Mittel, der sich signifikant mit $p < 0{,}0025$ von dem Normalwert unterscheidet. Dieses Ergebnis paßt gut zu der alten Beobachtung vom erniedrigten Serumphosphat bei der Rachitis.

Die Werte des Säure-Basestatus liegen trotz Äthernarkose immer noch auf der Seite einer leichten respiratorischen Acidose. Die rachitischen Tiere sind davon stärker betroffen, in Übereinstimmung mit einer Arbeit von STRÖDER und GARBE[69], die bei diesen kranken Tieren eine Lactatacidose fanden. Offensichtlich beeinträchtigt schon die kurze Exposition der Tiere im Äthertopf die Atmung, was auch KOCSIS[42] in Rattenversuchen bestätigt fand.
Eine wesentliche metabolisch bedingte Acidose, die man an einer starken Veränderung des Basenüberschusses ins Negative erkennen kann, ist bis zum Zeitpunkt der Operation jedoch noch nicht eingetreten, wie es bei der Verwendung der Barbituratnarkose in den Vorversuchen gefunden wurde.

Um die Beziehung der Leberphosphatgehalte zu den Serumphosphatwerten näher zu charakterisieren, wurde eine Korrelation aufgestellt. (Abb. 8).

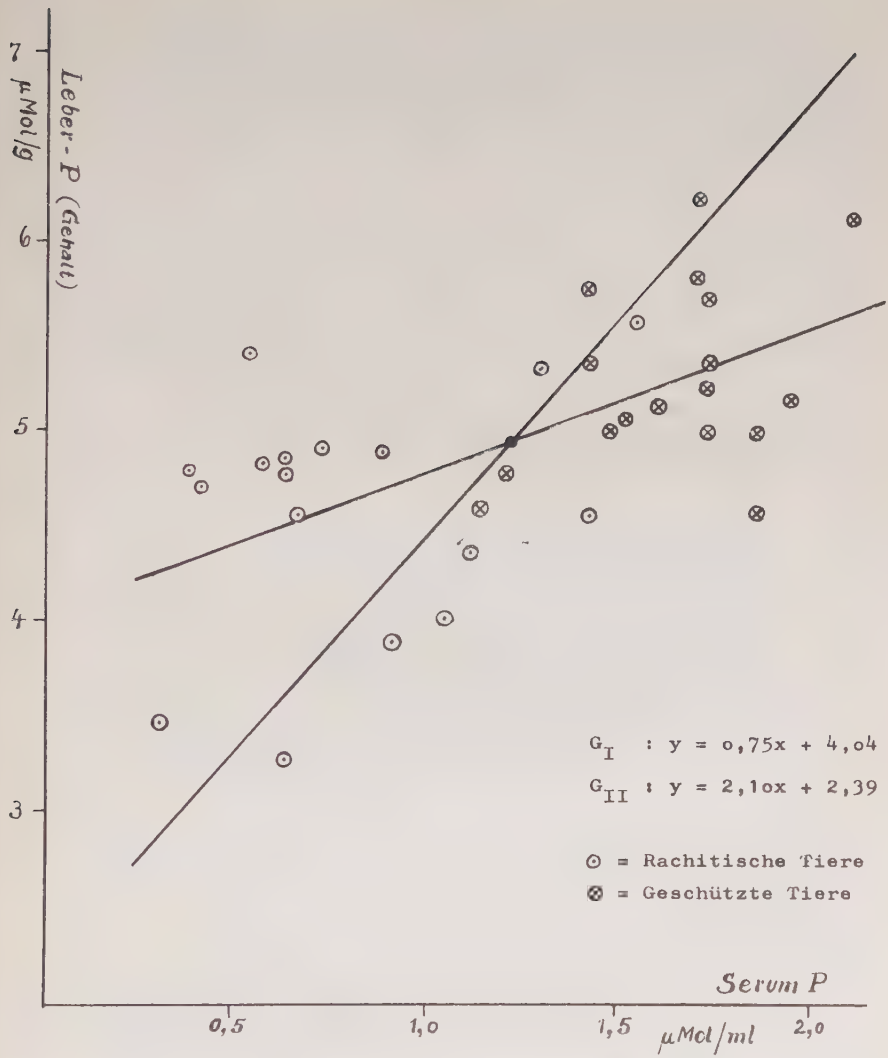

Abb. 8. Korrelation zwischen Leberphosphatgehalt (ohne Berücksichtigung des Extrazellulärraumes) und Serumphosphatspiegel.

Aus der graphischen Darstellung der beiden gleichzeitig an jedem Tier bestimmten Werte im Serum und in der Leber ist ersichtlich, daß mit abnehmendem Serumphosphat die Leberphosphatgehalte ebenfalls eine fallende Tendenz aufweisen (Korrelationskoeff.: $r = 0{,}597$, $p < 0{,}001$)

Die hier gezeigte Erniedrigung des Leberphosphatgehaltes bei den rachitischen Tieren besagt jedoch noch nicht, daß die Phosphatkonzentration auch intrazellulär gesunken ist. Bei der Gewebsgehaltsbestimmung wurde die Tatsache nicht berücksichtigt, daß in der Probe noch ein Teil Extrazellulärraum enthalten ist, der eine wesentlich niedrigere Konzentration aufweist als der Durchschnitt des Gewebes. Ein Abfall des Gehaltes könnte allein durch den Abfall im Extrazellulärkompartiment bewirkt werden.

Zusätzlich muß berücksichtigt werden, daß die rachitischen Tiere in der Diätperiode im Durchschnitt stärker zunehmen als die Tiere, die zur Prophylaxe Vitamin D erhalten. Aus dieser selbst bestätigten Beobachtung kann die Vermutung abgeleitet werden, daß die rachitischen Tiere möglicherweise ein Ödem ausbilden, welches den rascheren Gewichtsanstieg erklären könnte. Auch ein vermehrter extrazellulärer Raumanteil würde bei gleichbleibender Phosphatkonzentration einen verringerten Gewebsgehalt ergeben.

Aus diesem Grunde wurde eine orientierende Extrazellulärraumbestimmung (Plasmaraum) mit Jod-131 markiertem Albumin durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 7.

Rachitische Tiere:

	Serum-P mg%	Ipm Gewebe	Ipm Serum 0,1 ml	Ipm Gewebe 100 mg	%gehalt Serum im Gewebe(Vol%)
1.	1,5	6621,7	9020,0	1595,2	17,69
2.	1,2	7399,3	11223,0	1859,6	16,57
3.	2,8	9048,8	9817,9	1736,5	17,69

Geschützte Tiere:

	Serum-P mg%	Ipm Gewebe	Ipm Serum o,1 ml	Ipm Gewebe 1oo mg	%gehalt Serum Vol%
1.	4,o	6687,2	13138,7	2414,2	18,4
2.	4,1	4525,9	12950,o	1717,6	13,3
3.	5,7	5181,o	11343,7	1982,o	17,47

Ipm = Zahl der Impulse pro Minute

Tabelle 7.: Ergebnisse der Plasmaraumbestimmung mit J^{131}-Albumin.

Aus dem Resultat läßt sich jedoch kein Hinweis auf einen erhöhten Plasmaraum ablesen. Mit dem erhaltenen durchschnittlichen Wert von 16,9 Vol% Extrazellulärraum läßt sich die Intrazellulärkonzentration des Orthophosphates abschätzen. Er deckt sich weitgehend mit dem von DULCE und GÜNTHER [20] mit Hilfe von Inulin für die Leber der Ratte ermittelten Wert. Die aus Gewebsgehalt, Serumkonzentration und Volumenanteil Plasmaraum errechneten Werte für die Intrazellulärkonzentration sind in den Tabellen 5 und 6 angeführt.
Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{1oo \times C_{P\text{-Gehalt}} - 16,9 \times C_{P\text{-Serum}}}{1oo - 16,9} = \text{Intrazelluläre Phosphatkonzentration}$$

$C_{P\text{-Gehalt}}$ = Phosphatkonzentration des Lebergewebes (Gehalt)

$C_{P\text{-Serum}}$ = Phosphatkonzentration im Serum

Für die rachitischen Ratten wurde eine intrazelluläre Phosphatkonzentration von 5,45 /uMol/g Leber ermittelt, die sich immer noch signifikant mit $p < o,o25$ von dem Normalwert (6,13 /uMol/g) unterscheidet.

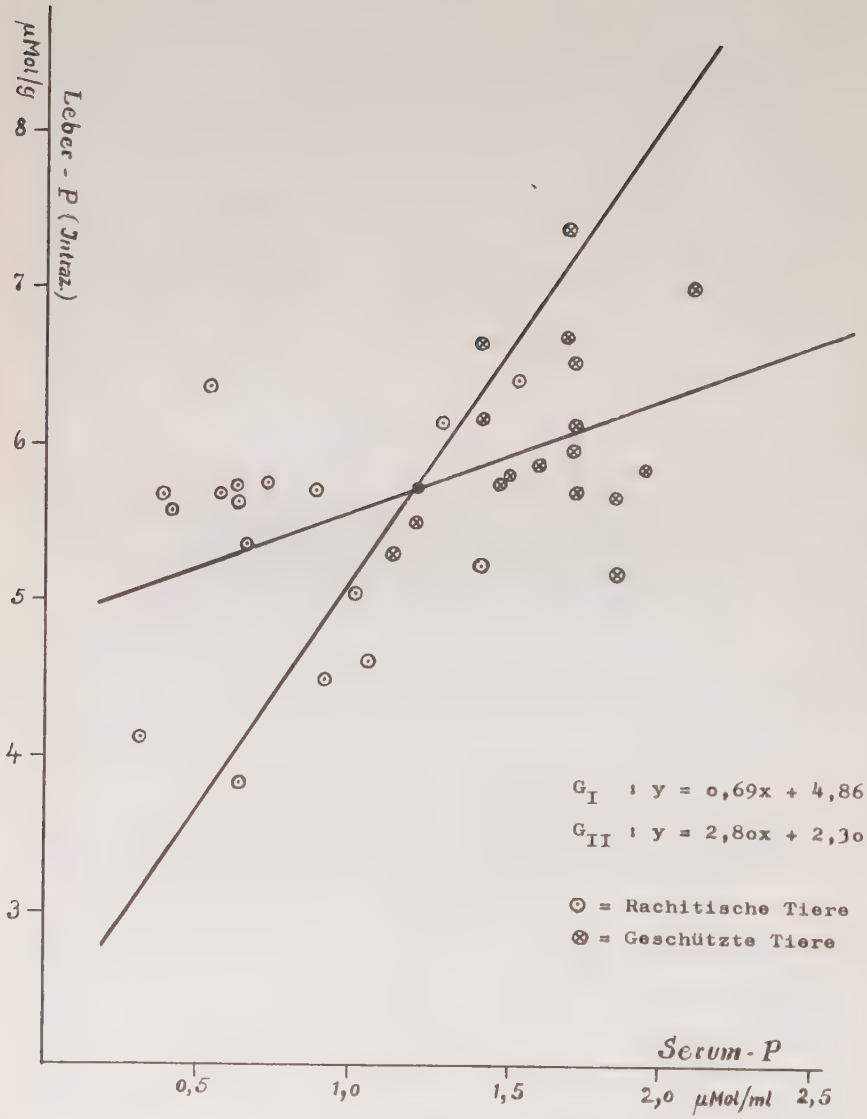

Abb. 9. Korrelation zwischen intrazellulärer Phosphatkonzentration der Leber und Serumphosphatspiegel.

Die graphische Aufzeichnung der auf diese Weise errechneten intrazellulären Phosphatkonzentrationen läßt immer noch eine abfallende Tendenz mit dem Serumphosphat erkennen. Der Korrelationskoeffizient von r = o,499,($p < o,o1$) läßt die Behauptung zu, daß auch die intrazelluläre Konzentration des Phosphates in der Leber bei rachitischen Ratten abnimmt. (Abb. 9)

Anmerkung :

Bei der Korrelation wurden noch folgende Zwischenwerte berücksichtigt, die bei der bisherigen Auswertung auf Grund des entweder zu hohen (rachitisch) oder zu niedrigen (geschützt) Serumphosphatspiegels zunächst eliminiert worden waren :

Serum-Phosphat		Leber-Phosphat	
mg%	uMol/ml	Gehalt uMol/g	Intrazellulär
Rachitische Tiere:			
4,1	1,29	5,33	6,151
4,5	1,42	4,57	5,21o
4,9	1,54	5,59	6,413
Geschützte Tiere:			
3,8	1,2o	4,79	5,52o
3,6	1,13	4,6o	5,3o6

DISKUSSION

Die Untersuchung des Verhaltens der intrazellulären Phosphatkonzentration bei der experimentellen Rachitis ist von besonderem Interesse für das Verständnis der bei der experimentellen Rachitis aufgefundenen Veränderungen im Gehalt der sogenannten energiereichen Phosphatverbindungen Adenosintri-, di- und monophosphat. Diese Verbindungen stellen das Bindeglied für die Kopplung des energieerzeugenden und -verbrauchenden Stoffwechsels der Zelle dar. Die Syntheserate in den Zellen hängt von verschiedensten Faktoren ab, von denen in den meisten Warmblüterzellen die Verfügbarkeit des Sauerstoffes für die Endoxydation der Wasserstoffbeladenen Coenzyme DPNH und TPNH die erste limitierende ist. Aber auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung ist die Abbaurate der Glucose durch verschiedene andere Faktoren beeinflußbar. Zur Kennzeichnung dieser den Stoffwechsel beeinflussenden und teilweise limitierenden Faktoren sind immer wieder große Anstrengungen gemacht worden.

LYNEN[48] und JOHNSON[39] haben 1941 eine Theorie vorgebracht, nach der die Umsatzrate des Sauerstoffes von der Verfügbarkeit des Phosphatacceptors ADP und von der Orthophosphatkonzentration abhängig sein soll.

Da man bei der Rachitis einen Zustand mit niedrigem Serumphosphat hat, muß an eine mögliche Beeinträchtigung der Umsatzrate der energieliefernden Reaktionen gedacht werden. Allerdings kann eine Beeinflussung des Stoffwechsels der Zellen erst dann diskutiert werden, wenn nachgewiesen ist, daß die intrazelluläre Phosphatkonzentration tatsächlich erniedrigt ist.

In dieser Arbeit wurden Daten erarbeitet, die für eine tatsächliche Erniedrigung der intrazellulären Phosphatkonzentration in der Leber bei rachitischen Ratten sprechen. Es muß nun abgewogen werden, ob die in vitro gefundene

Abhängigigkeit der Atmungsgeschwindigkeit der Mitochondrien, wie sie zum Beispiel von CHANCE und CONNELLY[8] und vielen anderen berichtet wurde, schon in vivo beobachtet werden kann.

Hinweise, die diese Vermutung belegen könnten, wurden schon 1932 von NITSCHKE und SCHNEIDER[54] gegeben, die bei rachitischen Tieren eine Grundumsatzerniedrigung fanden.

In einer neuen Arbeit berichtet WU[78] von einem Glycolyse- und Sauerstoffumsatz-fördernden Effekt steigender Konzentrationen von Phosphat im Inkubationsmedium bei Leberschnitten.

In jüngster Zeit ist von B. CHANCE[7] und anderen[62] ein kontrollierter Zustand (VI) isolierter Mitochondrien beschrieben worden, bei dem die Phosphatkonzentration sehr klein ist und Besonderheiten im Redoxzustand der Atmungskettenglieder auftreten.

Gerade diese letzten Arbeiten machen eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels durch die intrazelluläre Phosphatkonzentration in der intakten Zelle wahrscheinlich.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei rachitischen und mit Vitamin-D-geschützten Ratten wurde der Phosphatgehalt des Lebergewebes untersucht.

2. Zur Ermittlung der intrazellulären Phosphatkonzentration wurde eine orientierende Extrazellulärraumbestimmung durchgeführt.

3. Die Phosphatextraktion und -bestimmung erfolgten unter schonenden Bedingungen nach einer neuen Methode, die ausführlich beschrieben wird.

4. Die Untersuchungen ergaben, daß die Orthophosphatkonzentration des Lebergewebes sowie der Leberzelle bei der rachitischen Ratte statistisch signifikant erniedrigt waren (im Gewebe von 5,38 µMol/g auf 4,63 µMol, intrazellulär von 6,13 µMol/g auf 5,45 µMol).
In der Korrelation zeigte sich eine fallende Tendenz mit dem Serumphosphatspiegel.

5. Eine mögliche Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels der Zelle durch die Verminderung der intrazellulären Phosphatkonzentration wurde diskutiert.

Herrn Professor Dr.med. J. S t r ö d e r , Direktor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg, möchte ich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates meinen ergebenen Dank aussprechen.

Herrn Dr. rer. nat. A. G a r b e danke ich herzlich für seine freundlichen Ratschläge und wertvollen Anregungen, die mir bei meiner Arbeit eine große Hilfe waren.

LITERATURVERZEICHNIS

1) ALBRIGHT, F., E.C. REIFFENSTEIN — The Parathyroid Glands and metabolic bone Disease. The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1948

2) ASTRUP, P. et alt. — Der Säure-Base-Stoffwechsel, eine neue Darstellung. Radiometer-Sonderdruck TAS 8 (196o)

3) ASTRUP, P. — Erkennung der Störungen des Säure-Base-Stoffwechsels und ihre klinische Bedeutung. Sonderdr. Kli. Wschr. 35, 749-753 (1957)

4) BARTTER, F.C. — The effect of the parathyroid on phosphate excretion, in: GREEP, R.O. and TALMAGE, R.V. : The Parathyroids, Thomas, Springfield, p. 388 (1961)

5) BEKEMEYER, H. — Ein prophylaktischer Röntgen-Test zur biologischen Bestimmung von Vitamin D. Acta biol.med.germ., 4, 283-96 (196o)

6) BORLE, A.B. — Kalzium- und Phosphatstoffwechsel J. R. Geigy, Basel, 15-43 (1963)

7) CHANCE, B. — Controlled States in Mitochondria - State 6. Fed. Proc. 23, (2)I, 265 (1964)

8) CHANCE, B. C.M. CONELLY — Method for the estimation of the increase in concentration of adenosin diphosphate in muscle sarcosomes following a contraction. Nature, London, 179, 1235 (1957)

9) CHAPTAL, J., R. JEAN, R. GUILLAUMOT, G. G. MOREL — Etude des variations nyathémérales dans le sang et les urines de quelques constantes biologiques, notamment du phosphore et du calcium. Ann. Pédiat. 38, 9o-96 (1962)

10) CHEEK, D.B. — Extracellular volume,: its structure and measurement and the influence of age and disease. J. Pediat. (St. Louis),58, 1o3-25 (1961)

11) Mc COLLUM, E.V. et alt. — Studies on experimental rickets; effect of starvation on healing of rickets. Bull. Johns Hopkins Hosp., 33 31-33 (1922)

12) COPP, D.H. et alt. — Evidence for calcitonon - A new hormone from the parathyroid, that lowers blood calcium. Endocrinologie, 7o, 638 (1962)

13) COPP, D.H. E.C. CAMERON — Demonstration of a hypocalcaemic factor. Science, 134, 2o38 (1961)

14) COPP, D.H., A.G. DAVIDSON — Direct humoral control of parathyroid function in the dog. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1o7, 342 (1961)

15) CRAMER, C.F. — Progress and rate of absorption of radiophosphorus through the intestinal tract of rats. Canad. J. Biochem. 39, 499 (1961)

16) CRAMER C.F., A.P. SUIKER, D.H. COPP — Parathyroid influence on calcium and phosphorus absorption by the gut, in GREEP, R.O. and TALMAGE, R.V. The Parathyroids, Thomas, Springfield p. 158 (1961)

17) DALTON, J.C. — Effects of external ions on membrane potentials of a lobster giant axon. J. gen. Physiol. 41, 529 (1958)

18) De PRA, M., B. DE BENI, R. GATTI — Contributo allo studio dell'acidosi nel rachitismo commune. Clin. pediat. (Bologna) 45, 159-66 (1963)

19) Documenta GEIGY — Wissenschaftliche Tabellen J.R. Geigy S.A. Basel, 6. Auflage

20) DULCE, H.J., Th. GÜNTHER — Steuerung des zellulären Elektrolyt- und Wassergehaltes durch Hormone. Arch. exper. Path. 238, 368 (1960)

21) FANCONI, G. — Physiologie und Pathologie des Calcium- und Phosphatstoffwechsels. Helv. paediat. Acta 16, 192-319 (1961)

22) FANCONI, G. — Die Wahrung der biologischen Konstante "Plasmacalcium" und ihre Störungen. Schweiz. med. Wschr. 89, 471-78 (1959)

23) FIRSCHEIN, H.E. — Parathyroid hormone and Vitamin D. J. chron. Dis. 16, 283-29o (1963)

24) FISKE, C.H., Y. SUBBAROW — Colorimetric determination of phosphorus. J. biol. Chem., 66, 375-4oo (1925)

25) GARBE, A., J. STRÖDER — Untersuchungen über bestimmte Metabolite bei experimenteller Rachitis. Klin. Wschr. 41, 292-293 (1963)

26) GYÖRGY, P. — Über den Gehalt des Blutserums an Kalk und anorganischem Phosphor im Säuglingsalter. Jb. Kinderheilk. 99, 1 (1922)

27) HARRISON, H.E. — Vortrag, gehalten an der «Conference on Transfer of Calcium and Strontium across Biological Membrane,» Ithaca, New York, (1962)

28) HARRISON, H.E. — Vitamin D and calcium and phosphate transport. Pediatrics 28, 531-44 (1961)

29) HARRISON, H.E., HARRISON, H.C. — Intestinal transport of phosphate, action of vitamin-D, calcium and potassium. Amer. J. Physiol. 201, 1007 (1961)

30) HARRISON, H.E., HARRISON, H.C. — Transfer of Ca^{45} across the intestinal wall in vitro in relation to the action of vitamin D and cortisol. Amer. J. Physiol. 199, 265 (1960)

31) HASHIMURA, S., E.B. WRIGHT — Effect of ionic environment on excitability and electrical properties of frog single nerve fiber. J. Neurophysiol. 21, 24 (1958)

32) HOHORST, I.H. F.H.KREUTZ, Th.BÜCHER — Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in der Leber der Ratte. Bio. Z. 332, 23 (1959/60)

33) HÖVELS, O., D. REISS — Physiologie und Stoffwechsel des D-Vitamins. Ergebn. inn.Med. N.F. 11, 206-262

34) HOWARD, J.E. — Present knowledge of parathyroid function, with especial emphasis upon its limitations, aus: Bone Structure and Metabolism. ciba Found. Sympos. Wolstenholme G.E.W. and O. Connor C.M. editors. p.206, I. & A. Churchill, London, (1956)

35) HOWLAND, J., B. KRAMER — Calcium and Phosphorus Metabolism in the Serum in Relation to Rickets. Amer. Dis. Child. 22, 105 (1921)

36) ILLIG, R.
E. UEHLINGER
A. PRADER
Sekundärer Hyperparathyreoidismus bei Vit.-D-Mangel-Rachitis.
Helv. paediat. Acta 14, 566-579 (1959)

37) ISSELHARD, W.,
K. IRMSCHER, W. THORN
Die Relation von anorganischem Phosphat, Phosphokreatin, freiem und Gesamtkreatin in Warmblüterorganen bei verschiedener Belastung.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 268, 415-24 (1959)

38) IVERSEN-LENSTRUP, P.
On Blodets Fosforindhold hos Smaalbörn.
1. Norsk Paediat. Kongr. 1919

39) JOHNSON, M.J.
The role of aerobic phosphorylation in the PASTEUR-effect.
Science, 94, 2oo-2o2 (1941)

40) JONXIS, J.H.P.
Some investigations on rickets.
J. Pediat., 59, 6o7-15 (1961)

41) JONXIS, J.H.P.
Phosphate metabolism in rickets and tetany.
Helv. paediat. Acta 14, 491-96 (1959)

42) KOCSIS, M.
Dangers of anaesthesia in children with rickets.
Acta paediat. Acad. Sci. hung. 2, 2o9-215 (1961)

43) KRAUSE, E.-G.,
A. WOLLENBERGER
Extraktionsprozedur zur Bestimmung des wahren Orthophosphates in Herz- und Skeletmuskel von Warmblütern.
Bio. Z. 339, 315-26 (1964)

44) KRAUSE, E.-G.,
A. WOLLENBERGER
Auftrennung des Adenosindiphosphatpools des Skeletmuskels von Kaninchen.
Acta biol. germ. 13, 7-12, (1964)

45) LARDY, H.E.
Proceed. 3rd Intern. Congr. Biochem. (herausgegeben von L. LIEBECQ), p 2o7, New York: Academic Press 1956

46) LEVINSKI, N.G.,
D.G. DAVIDSON
Renal action of parathyroid extract in the chicken.
Amer. J. Physiol. 191, 53o (1957)

47) LOHR, H., W. RUPP
Experimentelle Studien über den Phosphorumsatz in Organen gesunder und rachitischer Ratten.
Z. Kinderheilk. 88, 51o-15 (1963)

48) LYNEN, F. — Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe. Justus Liebigs Ann. Chem. 546, 12o-141 (1941)

49) NETTER — Theoretische Biochemie. Springer Verlag 1959.

50) NEUMAN, W.F. — Chemical dynamics of bone mineral. University of Chicago Press, Chicago 1958

51) NICOLAYSEN, R., N. EEG-LARSEN, O.J. MALM — Physiologie of calcium metabolism. Physiol. Rev. 33, 424 (1953)

52) NICOLAYSEN, R. — Wirkung von Vitamin D an isolierten Darmschlingen. Acta physiol. scand. 22, 26o (1951)

53) NICHOLSON, T.F., G.W. SHEPHERD — The effect of damage to various parts of the renal tubule on the excretion of phosphate by the dog's kidney. Canad. J. Biochem. 37, 1o3 (1959)

54) NITSCHKE, A., M. SCHNEIDER — Grundumsatz an rachitischen und rachitisch-tetanischen Säuglingen. Zschr. Kinderheilk., 54, 1-9 (1932)

55) NORDIN, B.E.C. — Osteomalacie und Osteoporose. J.R. Geigy S.A., Basel, S. 47-82 (1963)

56) NORDIN, B.E.C. — The estimation of free calcium in the urine and its relevance to calculus formation. Brit. J. Urol., 31, 4o4 (1959)

57) NORDIN, B.E.C., R. FRAZER — The effect of intravenous calcium on phosphate excretion. Clin. Sci. 13, 477 (1957)

58) NORDIO, S., M. DE PRA — Relation between calcium-Phosphorus metabolism, KREBS-cycle and steroids. Helv. paediat. Acta 14, 518 (1959)

59) NORDIO, S. et alt. — Rapporti tra metabolismo calcio-fosforico e steroidi. Minerva paediat. (Torino) 11, 1426 (1959)

60) PAUPE, J., C. GENTIL, I. ANTENER — Mesure de l'acticité vitaminique D, premiers résultats obtenus au cours de désordres phosphocalciques chez l'enfant. Cah. Coll. Méd. Hop.Paris 2, 513 (1961)

61) PHILPOT, G.R. — Calcium metabolism in humans. Thesis, University of London 1958

62) QUAGLIARIELLO, E. S. PAPA — Control of the phosphorylating respiratory chain by inorganic phosphate. Federat. European Biochem. Societies III. Meating, Warzaw, 4-7 (April 1966)

63) RICHTERICH, R. — Klinische Chemie. Akademische Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1965

64) SCHACHTER, D., D.V. KIMBERG, — Aktive transport of calcium by the intestine; action and bio-assay of vitamin D. Amer. J. Physiol. 2oo, 1263 (1961)

65) SCHACHTER, D., S.M. ROSEN — Active transport of Ca^{45} by the small intestine and its dependence on vitamin D. Amer. J. Physiol. 196, 357 (1959)

66) SCHREIER, K. — Einige neue Gesichtspunkte zum Calciumstoffwechsel. I. u. II. I : Med. u. Ernährg. 4, 29-33 (1963) II: " " 4, 7o-72 (1963)

67) STEENDIJK, R. — The effect parathyroid extract on the serum concentration of calcium and inorganic phosphate in active and healing rickets. Acta paediat. (Stockholm) 53, 1o5 (1964

68) STEENDIJK, R. — On the pathogenesis of vitamin D deficient rickets and primary vitamin D resistent rickets. Helv. paediat. Acta 17, 65-85 (1962)

69) STRÖDER, J., A. GARBE — Über die Natur der metabolischen Acidos bei experimenteller Rachitis. Klin. Wschr. 41, 193-294 (1963)

70 STRÖDER, J., A. GARBE — Untersuchungen über den Energiestoffwechsel und den Kohlehydratstoffwechsel bei der Rachitis. Helv. paediat. Acta 18, 12-16 (1963)

71) TEREPKA, A.R., C.M. DOWSE, W.F. NEUMAN — Unifying concepts of parathyroid hormone action. AEC Research and Development Report, UR - 577 (196o)

72) THOMAS, L.J. — Ouabain contracture of frog heart; Ca^{45} - movement and effect of EDTA. Amer. J. Physiol. 199, 146 (196o)

73) UEHLINGER, E. — Die Regulation des Calciumstoffwechsels. Münch. med. Wschr. 106, 685-692 (1964)

74) UEHLINGER, E. — Die Kinetik des Calciumstoffwechsels. Verh. dtsch. Ges. Path. 47, 69-91 (1963)

75) WAHLER, B.E., A. WOLLENBERGER — Zur Bestimmung des Orthophosphats neben säure-molybdatlabilen Phosphorverbindungen. Bio. Z. 329, 508-520 (1958)

76) WILHELM, G. — Zur Pathogenese der Rachitis und Wirkungsweise des D-Vitamins. II. Mitteilung: Allgemeine Stoffwechselstörung außerhalb des Skeletsystems und Vitamin-D Wirkung. Z. Kinderheilk. 84, 623-653 (1960)

77) WOLLENBERGER, A., O. RISTAU, G.SCHOFFA — Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebsstücke. Pflügers Archiv 270, 399-412 (1960)

78) WU, R. — Rate-limiting factors in glycolysis and inorganic orthophosphate transport in rat-liver and slices. J. of Biolog. Chem. 240, 2373 (1965)

79) YENDT, E.R., T.B. CONNOR, J.E. HOWARD — In vitro calcification of rachitic rat cartilage in normal and pathological human sera with some observations on the pathogenesis of renal rickets. Bull. Johns Hopk. Hosp. 96, 1 (1955)

LEBENSLAUF

Am 22. November 1939 wurde ich in Iserlohn als Sohn des Kapellmeisters Heinrich Kolb und seiner Ehefrau Gertrud geb. Katz geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule, in die ich Ostern 1946 aufgenommen wurde, bestand ich die Aufnahmeprüfung in das Märkische Gymnasium zu Iserlohn, das ich im Frühjahr 1960 mit der Reifeprüfung abschloß.
Den vorklinischen Teil meines Medizinstudiums absolvierte ich an der Universität Tübingen. Nach dem ersten klinischen Semester wechselte ich zur Universität Wien. Seit dem Wintersemester 1963/64 war ich an der Universität Würzburg immatrikuliert, wo ich im Dezember 1965 das Medizinische Staatsexamen bestand.
Von April bis Juli 1966 war ich auf der Chirurgischen Abteilung des Amtskrankenhauses in Hemer beschäftigt.
Seit September 1966 arbeite ich als Medizinalassistent auf der Inneren Abteilung der Städtischen Krankenanstalten in Goslar.

Heinrich Kolb

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Heinrich Kolb